

Univerzita Karlova

Přírodovědecká fakulta

Studijní program: Speciální chemicko - biologické obory

Studijní obor: Molekulární biologie a biochemie organismů



Veronika Traganová

Využití zvířecích modelů pro studium patogeneze *Bordetella pertussis*

The use of animal models in the study of pathogenesis of *Bordetella pertussis*

Bakalářská práce

Školitel: RNDr. Jana Holubová, Ph.D.

Praha, 2017

Prohlášení:

Prohlašuji, že jsem tuto závěrečnou práci zpracovala samostatně, a že jsem uvedla všechny použité zdroje a literaturu. Tato práce ani její podstatná část nebyla použita pro získání jiného nebo stejného akademického titulu.

V Praze dne 20. 8. 2017

Poděkování:

Děkuji své školitelce, RNDr. Janě Holubové, Ph.D., za cenné rady a vstřícnost během vypracovávání mé bakalářské práce. Děkuji Mgr. Nele Klímové, za pomoc při studiu a dokončení práce. Děkuji také prof. Ing. Petru Šebovi, CSc. za možnost získat odborné zkušenosti v Laboratoři molekulární biologie bakteriálních patogenů (MBÚ AV ČR, v.v.i.).

Abstrakt:

Bakterie *B. pertussis* je striktně lidským patogenem a původcem onemocnění známého jako černý kašel. Vzhledem k nárůstu případů infekcí touto bakterií v proočkované populaci se studium přenosu *B. pertussis*, působení jejích faktorů virulence a testování účinnosti nových i stávajících vakcín proti černému kašli, stává velmi aktuálním tématem. Podrobný výzkum interakce bakterie s hostitelem *in vivo* však vyžaduje vhodnou volbu zvířecího modelu. Nejběžněji používaným testovacím modelem pro studium *B. pertussis* je myš domácí laboratorní, která ale po infekci nevykazuje typické příznaky nemoci. V oblasti výzkumu a testování vakcín se osvědčil také model novorozených prasat. Zdaleka nejlepším zvířecím hostitelem *B. pertussis* je nedávno objevený model paviána anubi, který výborně imituje prostředí lidského dýchacího traktu, imunitní odpověď i přenos mezi hostiteli. Tato práce shrnuje základní poznatky o modelových organizmech používaných v minulosti i v současnosti pro studium *B. pertussis*. Zároveň se zabývá srovnáním výhod a nevýhod jednotlivých zvířecích modelů.

Klíčová slova:

Bordetella pertussis, černý kašel, modelové organizmy, testování vakcín

Abstract:

Bordetella pertussis is a strictly human pathogen and a causative agent of whooping cough. The study of bacterial transmission, virulence factors and vaccine efficacy testing became a very relevant topic, due to the disease resurgence in well-vaccinated populations during the past decades. Detailed investigation of bacterial interactions *in vivo* requires a suitable animal model. The most common used animal for *B. pertussis* testing is a laboratory mouse, however mice are unable to develop the typical *B. pertussis* infection symptoms. In the field of vaccine research and testing, the newborn pig has also proved to be a suitable model. By far the best nonhuman host of *B. pertussis* is the recently discovered baboon model which can perfectly imitate the human respiratory tract conditions, immune response and also the host-to-host transmission. This thesis summarizes basic knowledge of model organisms used in the past and in the present for the study of *B. pertussis*. At the same time, it shows the comparison of the advantages and disadvantages of the discussed animal models.

Abstract:

Key words:

Seznam zkratek a jejich vysvětlení:

ACT	adenylát cyklázový toxin
A/J	kmen laboratorních myší
BALB/c	kmen laboratorních myší
BG agar	Bordet- Gengou agar
BPSM	kmen <i>B. pertussis</i>
BPZE1	kmen atenuovaných bakterií <i>B. pertussis</i>
BvgA/S systém	dvoukomponentový systém regulace exprese faktorů virulence (z angl. Bordetella virulence gene)
cAMP	cyklický adenosinmonofosfát
CFU	viabilní bakteriální kolonie (z angl. Colony forming unit)
C3H/HeJ	kmen laboratorních myší
D420	klinický izolát <i>B. pertussis</i>
DNT	dermonekrotický toxin
DPI	den po infekci
DTaP	očkovací látka proti záškrtu, tetanu a pertusi obsahující purifikované antigeny produkované <i>B. pertussis</i>
DTP	očkovací látka proti záškrtu, tetanu a pertusi obsahující usmrcené bakterie <i>B. pertussis</i>
ELISA	analytická metoda založená na interakci antigenu a protilátky (z angl. Enzyme-linked immunosorbent assay)
FHA	filamentózní hemaglutinin

FIM	fimbrie
HDP	ochranné proteiny na sliznici dýchacích cest (z angl. Host defensive protein)
IFN γ	interferon γ
IgA	imunoglobulin A
IgE	imunoglobulin E
IgG	imunoglobulin G
IL	interleukin
LOS	lipooligosacharid
MWGT	měření přírůstku hmotnosti myši (z angl. Mouse weight gain test)
NK buňky	cytotoxické buňky (z angl. Natural killer)
pBD-1	ochranný protein na sliznici dýchacích cest prasete
PRN	pertaktin
PTX	pertusový toxin
RGD	sekvence obsahující aminokyseliny Arginin-Glycin-Asparagin
Rho GTPáza	signalizační enzym hydrolyzující guanosintrifosfát
s-IgA	sekreční imunoglobulin A
TCT	tracheální cytotoxin
Th 1	pomocné T buňky typu 1
Th 2	pomocné T buňky typu 2
Th 17	pomocné T buňky typu 17
T _{RM}	paměťové T lymfocyty přítomné na sliznicích (z angl. Tissue – resident memory)
Tohama I	kmen <i>B. pertussis</i>

TLR-4	receptor rozeznávající cizorodé antigeny (z angl. Toll-like receptor)
WHO	světová zdravotnická organizace (z angl. World health organisation)

Obsah

1	Úvod	1
2	<i>Bordetella pertussis</i>	2
2.1	Faktory virulence	2
2.1.1	Adheziny	2
2.1.2	Toxiny	3
2.2	Bvg systém	4
3	Černý kašel	5
3.1	Patogeneze	5
3.2	Imunitní reakce	5
3.3	Očkování	6
4	Modelové organizmy	8
4.1	Myš domácí laboratorní (<i>Mus musculus</i>)	8
4.1.1	Infekce myši bakterií <i>B. pertussis</i>	8
4.1.2	Využití modelu myši	9
4.1.2.1	Výzkum faktorů virulence	9
4.1.2.2	Výzkum tvorby biofilmu	9
4.1.2.3	Výzkum vakcín	10
4.1.3	Nevýhody modelu myši pro studium <i>B. pertussis</i>	12
4.2	Potkan obecný laboratorní (<i>Rattus norvegicus</i>)	14
4.2.1	Infekce potkana bakterií <i>B. pertussis</i>	14
4.2.2	Využití modelu potkana	15
4.3	Králík obecný laboratorní (<i>Oryctolagus cuniculus</i>)	15
4.3.1	Využití modelu králíka	15
4.3.2	Nevýhody modelu králíka pro studium <i>B. pertussis</i>	17
4.4	Prase domácí laboratorní (<i>Sus scrofa domesticus</i>)	17

4.4.1	Infekce modelu prasete bakterií <i>B. pertussis</i>	17
4.4.2	Využití modelu prasete.....	18
4.4.3	Nevýhody modelu prasete pro studium <i>B. pertussis</i>	19
4.5	Makak rhesus (<i>Macaca mulatta</i>).....	20
4.5.1	Infekce modelu makaka bakterií <i>B. pertussis</i>	20
4.5.2	Nevýhody modelu makaka pro studium <i>B. pertussis</i>	20
4.6	Pavián anubi (<i>Papio anubis</i>)	21
4.6.1	Infekce modelu paviána bakterií <i>B. pertussis</i>	22
4.6.2	Využití modelu paviána	22
4.6.2.1	Výzkum přenosu infekce bakterie <i>B. pertussis</i> mezi hostiteli	22
4.6.2.2	Výzkum účinnosti vakcín proti černému kašli	23
4.6.2.3	Výzkum očkování novorozenců a maternální očkování	23
4.6.3	Nevýhody modelu paviána pro studium <i>B. pertussis</i>	25
4.7	Hostitel <i>Dictyostelium discoideum</i>	25
5	Závěr	27
6	Literatura	28

1 Úvod

Bordetella pertussis je patogenní bakterie způsobující akutní respirační onemocnění známé jako černý nebo také dávivý kašel. Nemoc ohrožuje především novorozené děti a děti předškolního věku, u kterých může vést k fatálním následkům.

Navzdory očkování je v současné době pozorovatelný výrazný nárůst případů infekcí *B. pertussis*. V důsledku toho se mnoho vědeckých skupin zabývá intenzivním výzkumem molekulárních mechanizmů a patofyziologie infekce *B. pertussis*, s cílem využít nové poznání pro vývoj bezpečných a účinných očkovacích látek. Klíčovým bodem těchto studií je volba vhodného modelového organismu. Na vhodných modelech bude možné pozorovat a lépe pochopit mechanismy infekce *B. pertussis*, reakce imunitního systému hostitele a v neposlední řadě účinky nově vytvářených vakcín.

B. pertussis je striktně lidským patogenem, avšak pro laboratorní výzkum je využíváno modelů myši, selete, nebo paviána *Papio anubis*.

Náplní této práce je shrnout základní poznatky týkající se *B. pertussis* jako patogenu, onemocnění černého kašle a porovnat v minulosti a současnosti používané druhy modelových organismů z pohledu schopnosti kolonizace bakterií *Bordetella pertussis* a průběhu infekce. Cílem je lépe porozumět chování bakterie v různých typech hostitelů a přednést výhody a nevýhody používaných modelů pro různé typy studií.

2 *Bordetella pertussis*

Bordetella pertussis je nepohyblivá, striktně aerobní gram-negativní bakterie ovoidního tvaru. Poprvé byla objevena v roce 1900 belgickými mikrobiology J. Bordetem a O. Gengou, kteří ji identifikovali jako původce onemocnění černého kašle. Izolovat se ji však podařilo až o 6 let později, a to díky kultivaci na Bordet-Gengou médiu s obsahem ovčí krve (Bordet 1906, cit. dle Guiso, 2009).

Bordetella pertussis je specifický lidský patogen způsobující onemocnění zvané černý kašel, dávivý kašel (anglicky whooping cough), nebo také pertuse. Původcem černého kašle může být i vývojově příbuzná bakterie *Bordetella parapertussis*, která má ale na svědomí jen asi 14% všech onemocnění a je spojována s jejich mírnějším průběhem (Bergfors et al., 1999; Cherry et al., 2012). Společným předkem obou bakterií je bakterie *Bordetella bronchiseptica*, infikující řadu různých druhů savců (Parkhill et al., 2003).

2.1 Faktory virulence

Patogenní bakterie osidlující sliznice produkují faktory virulence, nejčastěji adhezivní látky a toxiny, zajišťující snadnější infekci a kolonizaci daného hostitele.

Nejdůležitějšími faktory virulence *B. pertussis*, spojenými s adhezí na sliznici, jsou filamentózní hemagglutinin, pertaktin a fimbrie. Kromě adhezivních proteinů produkuje *B. pertussis* také toxiny, z nichž nejvýznamnější jsou pertusový toxin, adenylát cyklázový toxin, tracheální cytotoxin, dermonekrotický toxin a lipooligosacharid působící jako endotoxin. Faktory virulence *B. pertussis* nebo jejich fragmenty jsou také součástí nebuněčných vakcín proti černému kašli (de Gouw et al., 2011).

2.1.1 Adheziny

Filamentózní hemagglutinin (FHA), je 220 kDa velký protein přítomný na povrchu bakterie *B. pertussis*, a zároveň sekretovaný do média. Zajišťuje adhezi bakterie na epitelální buňky v dýchacím traktu hostitele, a také na povrch monocytů a makrofágů (Liu et al., 1997).

Dalším adhezivním proteinem, vázaným na membráně *B. pertussis*, je pertaktin (PRN). Ten se váže na savčí epitelální buňky respiračního traktu skrze sekvenci RGD, neboli sekvenci obsahující aminokyseliny Arginin-Glycin-Asparagin (Leininger et al., 1991), a poskytuje bakterii ochranu před neutrofily (Inatsuka et al., 2010).

Fimbrie (FIM) jsou vláknité struktury na membráně gram-negativních bakterií. Slouží jako první záchytný mechanismus v nově kolonizovaném hostiteli a umožňují tak membránovému FHA navázání na buňky epitelu dýchacích cest. V současné době se také ukazuje, že FIM a FHA jsou společně schopné potlačit imunitní odpověď hostitele a oddálit vznik zánětlivé reakce na kolonizované sliznici (Scheller et al., 2015).

2.1.2 Toxiny

Pertusový toxin (PTX) je specifický exotoxin *B. pertussis* skládající se z podjednotky A a oligomeru B. Podjednotka A katalyzuje ribozylaci inhibiční podjednotky G proteinů, čímž dochází ke k deregulaci endogenní adenylyl-cyklázy produkující cyklický adenosin monofosfát (cAMP). Oligomer B se váže na membránové receptory a může způsobit zvýšení koncentrace fosfolipázy C. Oba tyto procesy vedou k narušení fungování signálních drah hostitelské buňky (Hazes et al., 1997; Katada et al., 1983; Wong et al., 1996).

Adenylát cyklázový toxin (ACT) je sekretovaný toxin *B. pertussis*. ACT má schopnost vázat se a integrovat do téměř jakékoli hostitelské eukaryotní buňky. Nejnáchylnější jsou však buňky vrozeného imunitního systému, kvůli přítomnosti integrinových receptorů $\alpha_M\beta_2$ (Mac-1, CD11b/CD18, CR3), na které se ACT váže s větší afinitou (Guermonprez et al., 2001). ACT katalyzuje po vniknutí do buňky nekontrolovatelnou tvorbu cAMP molekul, narušujících správné fungování signálních kaskád vedoucích k fagocytóze, čímž potlačuje protizánětlivé reakce v organismu hostitele (Confer et al., 1982). Prostřednictvím hydrofóbní domény vytváří toxin póry v cytoplazmatické membráně hostitelské buňky a způsobuje tak její lyzi (Masin et al., 2016).

Tracheální cytotoxin (TCT) je monomer peptidoglykanu běžně syntetizovaný bakteriemi během růstu nebo obnovy buněčné stěny, *B. pertussis* jej však neumí efektivně recyklovat a během infekce se dostává do těla hostitele. Toxin působí cytotoxicky na řasinkový epitel vdýchacích cestách hostitele. Na modelu epitelálních buněk byla také zjištěna schopnost TCT

inhibovat syntézu DNA v infikovaných buňkách (Cookson et al., 1989; Rosenthal et al., 1987). TCT díky své peptidoglykanové struktuře aktivuje odpověď vrozeného imunitního systému (Kaneko et al., 2004).

Dermonekrotický toxin (DNT) je tepelně labilní toxin produkovaný *B. pertussis* způsobující lokální nekrózy (Cowell et al., 1979). DNT je schopen v hostitelské buňce odštěpit amidovou funkční skupinu z Rho proteinu a tím nenávratně aktivovat jeho GTP-ázovou aktivitu, čímž ovlivňuje tvorbu cytoskeletu (Masuda et al., 2000).

Lipooligosacharid (LOS) je endotoxin přítomný na vnější membráně bakterie *B. pertussis* (Le Dur et al., 1980). Skládá se z penta – acetylovaného lipidu A navázaného na oligosacharidové jádro (Caroff et al., 2001). Během pokusů s LOS kmenů *B. pertussis*, *B. parapertussis* a *B. bronchiseptica* byla zjištěna schopnost LOS potlačit protizánětlivou imunitní odpověď hostitelského organismu (Harvill et al., 2000).

2.2 Bvg A/S systém

B. pertussis je díky Bvg A/S dvousložkovému systému (z angl. Bordetella virulence gene) schopna regulovat expresi genů pro produkci faktorů virulence. Bvg lokus v chromozomu bakterie kóduje mimo jiné proteiny BvgA a BvgS. BvgS je transmembránový senzor, u kterého v případě vhodných vnějších podmínek, podobných dýchacímu traktu hostitele, dochází k autofosforylaci cytoplasmatické kinázové domény a transportu fosfátu na protein BvgA v cytoplazmě. BvgA pak přímo aktivuje transkripci genů pro faktory virulence, stejně jako pro samotné proteiny Bvg. Takto dochází k přechodu z nepatogenní, tedy Bvg⁻ fáze bakterie, na infekční fázi s aktivním Bvg A/S systémem, kdy dochází k produkci všech adhezínů a toxinů napomáhajících účinnější kolonizaci nového hostitele (Roy et al., 1989; Stibitz et al., 1991; Uhl et al., 1994).

3 Černý kašel

Černý kašel je akutní onemocnění dýchacího traktu způsobené bakterií *B. pertussis* a *B. parapertussis*. Výjimečně se u člověka může objevit také infekce *B. bronchiseptica*, která však infikuje především savce (Gueirard et al. 1995). Nemoc postihuje epitel horních cest dýchacích a projevuje se zejména silnými záchvaty dávivého kašle, které mohou hlavně u novorozenců a malých dětí vést až k dechové nedostatečnosti a s ní spojeným fatálním následkům. Bakterie dále způsobuje leukocytózu, intra-alveolární krvácení a nekrózu (Paddock et al., 2008). U starších jedinců má infekce zpravidla mírnější průběh (Aslan et al., 2016).

V posledních letech dochází ve vyspělých zemích světa k výraznému nárůstu onemocnění nejen u dětí, ale i u adolescentů a dospělých, a to navzdory vysoké proočkovanosti populace (Chlibek et al., 2017; Prevention, 2012; Winter et al. & Centers for Disease Control and Prevention (CDC), 2014).

3.1 Patogeneze

B. pertussis je přenášena kapénkovou infekcí při kontaktu s nakaženými jedinci. Nově probíhající studie na modelovém organismu *Papio anubis* však dokazují také přenos vzduchem na větší vzdálenost (Warfel et al., 2012 B). Po vdechnutí hostitelem se bakterie zachytí na řasinkovém epitelu horních cest dýchacích, kde se díky produkci adhezinů usídí a je schopna pronikat do epiteliálních buněk sliznice. Produkované toxiny zabraňují správné funkci řasinkového epitelu a způsobují jeho odumírání, což znesnadňuje transport hlenu v dýchacích cestách a zapříčiňuje pro pertusi typický dávivý kašel (Paddock et al., 2008).

3.2 Imunitní reakce

Ihned po interakci *B. pertussis* s buňkami řasinkového epitelu se v těle hostitele spouští vrozená imunitní reakce. Jako první reagují makrofágy a dendritické buňky zahajující tvorbu interleukinu 1 (IL-1) a interleukinu 23 (IL-23) důležitých pro maturaci pomocných protizánětlivých T lymfocytů – Th17 (Fedele et al., 2010). Th17 jsou zodpovědné za zvýšení aktivity neutrofilů a NK buněk (z anglického natural killer). Antigen prezentující buňky,

dendritické buňky nebo makrofágy jsou dále zodpovědné za produkci interleukinu 12 (IL-12), který spouští diferenciaci Th1 pomocných buněk. Th1 lymfocyty následně produkují interferon γ (IFN γ) působící přeměnu makrofágů na jejich aktivní formu, čímž výrazně zvýší jejich baktericidní aktivitu (Bonecchi et al., 1998). V současné době byla také odhalena důležitá role lokálních CD4 T_{RM} lymfocytů přítomných na sliznicích hostitelského organismu. Tyto buňky jsou zodpovědné za imunitní paměť na povrchu dané tkáně a prostřednictvím sekrece cytokinů aktivují rychlou produkci protilátek a eliminaci opsonizovaných bakterií fagocyty (Wilk et al., 2017).

B. pertussis je prostřednictvím faktorů virulence schopná modulovat imunitní odpověď hostitele. Jak již bylo zmíněno (viz 2.1.2), ACT působí na buňky imunitního systému hostitele lyticky prostřednictvím porace cytoplazmatické membrány, a také zabraňuje přirozenému procesu fagocytózy narušením signálních drah fagocytujících buněk. ACT a FHA inhibují produkci zmíněného IL-12, čímž potlačují protizánětlivou reakci (McGuirk et al., 2002; Spenseri et al., 2006). Donedávno se také předpokládalo, že FHA stimuluje vznik interleukinu 10 (IL-10), který cíleně tlumí imunitní odpověď (McGuirk et al., 2002). Ve studii (Romero et al., 2016) však nebyly tyto výsledky potvrzeny. Zvýšenou produkci IL-10 má pravděpodobně na svědomí endotoxin LOS, který se nacházel jako kontaminanta purifikovaného FHA (Romero et al., 2016).

3.3 Očkování

Proti černému kašli jsou v dnešní době běžně používány dva základní typy vakcín. Celobuněčná vakcína, obsahující usmrcené buňky bakterie, a nebuněčná vakcína, složená z několika antigenů *B. pertussis*. Obě verze vakcín jsou sdruženy s očkováním proti tetanu a diftérii, neboli záškrtu, a označují se tedy jako DTP nebo acelulární verze DTaP.

V 90. letech minulého století byla celobuněčná vakcína nahrazena vakcínou nebuněčnou, a to zejména ve vyspělých zemích. Nebuněčné vakcíny obsahují různé kombinace purifikovaných bakteriálních antigenů FIM, PRN, PTX, FHA (Gustafsson et al., 1996). V posledních letech se ale projevují nedostatečnosti těchto vakcín. Ukazuje se, že celobuněčná vakcína chrání očkované jedince účinněji, než nebuněčná vakcína (Klein et al., 2013).

Rozdílnou efektivitu vakcín má pravděpodobně na svědomí různá imunitní odpověď vyvolaná očkováním. Nebuněčná vakcína zajišťuje produkci Th2 lymfocytů, a podporuje tak vznik protilátek. Celobuněčná vakcína ale oproti nebuněčné vakcíně spouští odpověď Th1 a Th17 lymfocytů, stejně jako je tomu během přirozené infekce bakterií (Kolls et al., 2010; Warfel et al., 2016).

4 Modelové organizmy

Vzhledem k nárůstu pacientů s infekcí *B. pertussis* je nutno lépe porozumět fyziologii a patogenезi bakterie, stejně tak jako reakci hostitelského organismu. Tyto poznatky mohou vést k vývoji účinnější formy ochrany proti nemoci a efektivnějšímu boji s touto bakterií. Přestože je člověk jediným přirozeným hostitelem *B. pertussis*, neodmyslitelnou součástí výzkumu interakce bakterie s hostitelem je použití vhodných zvířecích modelů.

Nejběžnějším a nejpoužívanějším modelovým organismem je laboratorní myš. Pro výzkum *B. pertussis* jsou také používány modely potkanů, králíků, selat nebo primátů.

4.1 Myš domácí laboratorní (*Mus musculus*)

Model myši je v medicíně a biomedicínských oborech používán k výzkumu již od 16. století (Hedrich, 2012). Její nepopíratelnou výhodou je velikost, dostupnost, krátká generační doba a snadný chov. Při studiu bakterie *B. pertussis* je myš nejčastěji využívána pro zkoumání faktorů virulence a jejich účinků při infekci a kolonizaci hostitele (Goodwin et al., 1990). Dále je myš používána při testování toxicity a efektivity vakcín (Queenan et al., 2014).

4.1.1 Infekce modelu myši bakterií *B. pertussis*

Podstatnou výhodou myšího modelu je podobnost povrchu dýchacího ústrojí s přirozeným hostitelem bakterie, člověkem. Bakterie se díky adhezínům přichytí na řasinkový epitel horních cest dýchacích a současně se také může vázat na makrofágy myšího hostitele. Dochází zde k produkci faktorů virulence způsobujících potlačení imunitní odpovědi a leukocytózu. Samotná infekce trvá u myši zhruba 4 týdny (Mills et al., 1993).

Do místa infekce se během prvních týdnů soustředí imunitní odpověď složek vrozené imunity, tedy makrofágy, dendritické buňky a NK buňky. Následuje rychlá odpověď adaptivní imunity prostřednictvím Th1 a Th17 lymfocytů (Mills et al., 1993).

4.1.2 Využití modelu myši

4.1.2.1 Výzkum faktorů virulence

Studium faktorů virulence je důležité pro pochopení molekulární podstaty patogeneze *B. pertussis* a nalezení účinnějších mechanismů boje proti černému kašli.

Během studií zaměřených na patogenezí onemocnění se přistupuje k intranazální infekci modelového organismu. Suspenze živých bakterií se aplikuje do nozder myši, která jí vdechne, nebo dochází k opakovanému vystavení aerosolu bakteriální suspenze (Goodwin et al., 1990; Mills et al., 2015).

Ve studii Weiss et al. (1989) bylo pro ověření funkce faktorů virulence zhotoveno několik mutantních kmenů *B. pertussis* se změněnými geny pro expresi PTX, ACT nebo DNT. Po následné infekci myši mutovanými kmeny se ukázalo, že na rozdíl od běžně používaných laboratorních kmenů *B. pertussis*, mutantní kmeny neprodukující PTX a ACT nebyly schopné způsobit letální infekci, přestože kolonizovaly dýchací epitel testovaných jedinců. Oproti tomu kmen s mutovaným genem pro expresi DNT byl stejně virulentní jako kontrolní kmen bakterie (Weiss et al., 1989).

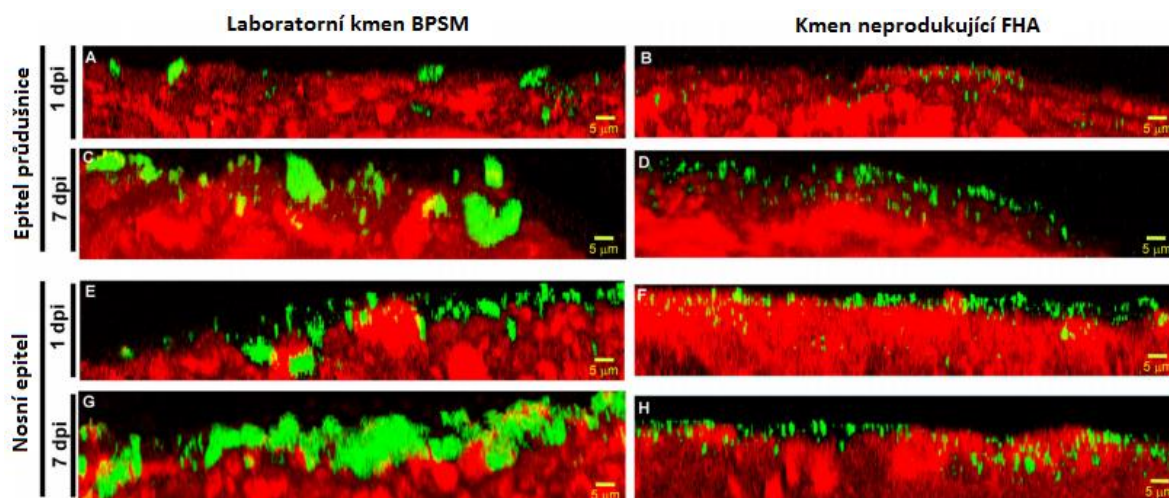
Při studii zaměřující se na účinky PTX byla skupina myší infikována bakterií s delecí genu kódujícího PTX a porovnávána se skupinou infikovanou laboratorním kmenem *B. pertussis*. Bakterie produkující PTX měly schopnost potlačit protizánětlivou odpověď modelového organismu (Andreasen et al., 2008; Connelly et al., 2012).

4.1.2.2 Výzkum tvorby biofilmu

B. pertussis je na abiotickém povrchu schopna vytvořit biofilm, tedy souvislou vrstvu bakterií obklopenou bakteriální matrix (Serra et al., 2008). Díky použití myšího modelu bylo možné dokázat také tvorbu biofilmu v dýchacích cestách hostitele bakterií *B. pertussis* a *B. bronchiseptica* (Sloan et al., 2007).

Během podrobnější studie zaměřené na schopnost tvorby biofilmu bakterií *B. pertussis* byl z infikovaných myší získán epitel nosní dutiny a epitel průdušnice. Ukázalo se, že FHA hraje stěžejní roli při tvorbě biofilmu *in vivo*. Bakterie s deletovaným genem pro expresi FHA výrazně

zaostávaly v kolonizaci dýchacího epitelu za laboratorním kmenem produkujícím FHA (viz Obrázek 1) (Serra et al., 2011).



Obrázek 1: Řezy epitelem nosní dutiny a průdušnice myši infikovaných laboratorním kmenem BPSM a kmenem s delecí v genu pro produkci FHA. Snímky byly zhotoveny 1. a 7. den po infekci (DPI). Tkáně byly zafixovány. *B. pertussis* (znázorněna zeleně) byla detekována polyklonálním králičím sérem a oslí sekundární protilátkou značenou Alexa Fluor 488. Dýchací epitel (znázorněn červeně) byl detekován barvením F-aktinu. (Převzato a upraveno ze Serra et al., 2011).

4.1.2.3 Výzkum a testování účinnosti vakcín proti černému kašli

Pro základní výzkum účinnosti vakcín se přistupuje ke dvěma různým postupům infekce myši: intracerebrální infekci, známé také jako test dle Kendrickové, a vpravení bakterie do dýchacích cest očkovanych myši. Toxicita nově vytvářených vakcinačních látek pak může být testována pozorováním změn na tělesné hmotnosti myši, neboli MWGT (z anglického mouse weight gain test), testem leukocytózy a histaminovým testem.

Test dle Kendrickové spočívá v očkování skupiny myši testovanou vakcínou. Následně je do mozku myši injekcí vpravena letální dávka živých bakterií, která se liší v závislosti na použitém kmenu *B. pertussis* (Kendrick et al., 1947, Weiss & Mary, 1989). Na základě životaschopnosti, změn na váze a měření přítomnosti protilátek v séru odebraném infikovaným jedincům se vyhodnotí účinnost použité vakcíny. Tímto způsobem se ověřuje zejména účinnost celobuněčné vakcíny. Vzhledem ke sporným výsledkům pro testování nebuněčných vakcín vyráběných v Evropě a Severní Americe, byl test dle Kendrickové v těchto zemích pro nebuněčnou vakcínu považován jako neprůkazný. V posledních letech však proběhly studie

dokazující, že je možnost aplikovat test intracerebrální inokulací myši pro nebuněčné vakcíny jakékoli výroby (Gaines-Das et al., 2009; WHO TRS 979, 2013; Xing et al., 2014).

V mnoha studiích prováděných na myších modelech se přistupuje k infikování dýchacích cest jak imunizovaných, tak neimunizovaných myši. Myši mohou být dle potřeby experimentu opět očkované testovanou vakcínou nebo kontrolním vzorkem fyziologického roztoku. Samotná infekce, která probíhá zhruba 2-3 týdny po očkování zvířat, se provádí zavedením bakteriálního roztoku do nozder myši nebo prostřednictvím opakovaného vystavování aerosolu (Mills et al., 2015). Kontrola průběhu infekce může probíhat několika způsoby. Důležité je zejména přežití nakažených myši, dále dochází k detekci množství protilátek proti faktorům virulence *B. pertussis*, kontrole leukocytózy, a v neposlední řadě také k rozboru plic usmrčených zvířat jejich homogenizací a roztěrem na agarové plotny v průběhu různých fází nákazy (Mills et al., 2015). Infekce dýchacích cest myši se využívá hlavně při kontrole účinnosti v současné době používaných a nově vytvářených nebuněčných vakcín (Han et al., 2015; Kwon et al., 2017). Přistoupit k testování účinnosti prostřednictvím intranazální infekce lze i u celobuněčné vakcíny (Queenan et al., 2014).

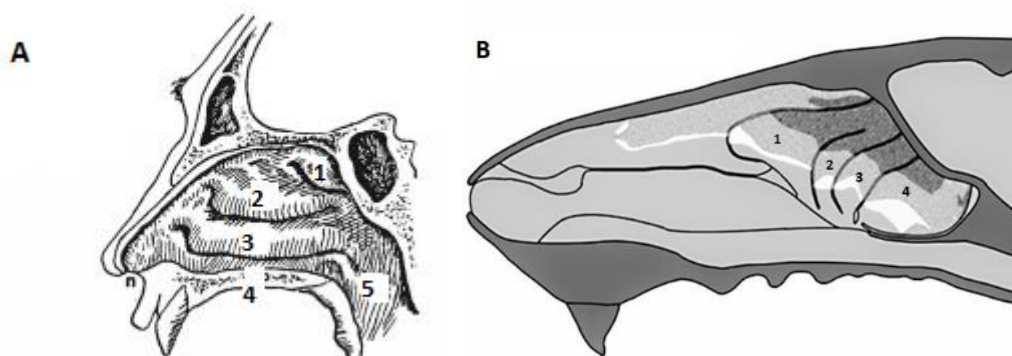
MWGT je prováděn při zkoumání toxicity především nových potenciálních vakcín. Dochází k porovnání přírůstku tělesné váhy jedinců očkovaných danou látkou v porovnání se zvířaty ošetřenými fyziologickým roztokem. Myši jsou váženy před vpravením vakcíny do organismu a následně v průběhu studie pravidelně kontrolovány. Pokud nedojde k úbytku váhy nebo výraznému rozdílu příbytku na váze mezi kontrolní skupinou a testovanou skupinou zvířat, neboli látka nezpůsobila vážnější projevy nemoci a neohrozila organismus myši, je vakcína vyhodnocena jako netoxická (WHO TRS 979, 2013, Kwon et al., 2017).

Test leukocytózy se provádí rozbořem krevních vzorků odebraných očkovaným jedincům několik dnů po ošetření vakcínou. Počet leukocytů v krvi očkovaných zvířat je následně porovnán se skupinou ošetřenou fyziologickým roztokem. Přesná kritéria pro vyhovění tomuto testu nejsou oficiálně stanovena, ale odchylka v počtu leukocytů mezi dvěma testovanými skupinami by neměla být příliš velká (Dias et al., 2013; Kwon et al., 2017; WHO TRS 979, 2013).

Histaminový test je využíván zejména k testování toxicity nebuněčných vakcín obsahujících purifikovaný pertusový toxin. Myši ošetřené PTX nebo vakcínou s tímto antigenem vykazují citlivost na histamin (Gomez et al., 2007).

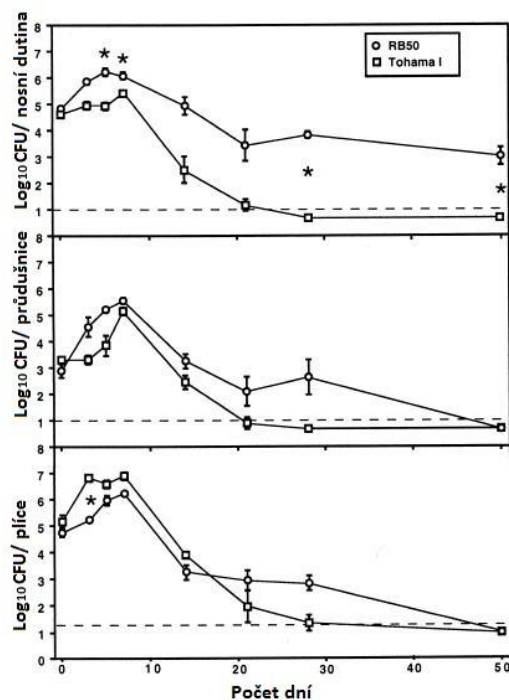
4.1.3 Nevýhody modelu myši pro studium *B. pertussis*

B. pertussis je bakterie přirozeně infikující pouze lidské hostitele. Studium na zvířecích modelech tedy může být provázeno řadou úskalí. U myšího modelu nelze pozorovat některé typické příznaky propuknutí nemoci, například kašel. Nedochází ani k přirozenému přenosu infekce mezi jedinci. Podstatným problémem tohoto modelu je schopnost *B. pertussis* kolonizovat dýchací trakt myšího hostitele. Anatomie dutiny nosní se oproti lidské liší velikostí, tvarem a také uspořádáním (viz Obrázek 2). Hlodavci dýchají převážně nosem a oproti primátům a člověku mají složité větvení nosních průchodů, které lépe chrání dolní cesty dýchací před vdechnutím nečistot nebo patogenů (Harkema et al., 2006).



Obrázek 2: **Porovnání anatomie nosní dutiny člověka a myši.** Model lidského nosu (A). Nosní dírka (n), horní (1), střední (2) a dolní (3) průchod nosní, tvrdé patro (4), ústí hrtanu a hltanu (5) (Převzato a upraveno z Harkema et al., 2006). Model myšího nosu (B). Průchody nosní u myši (1-4) (Převzato a upraveno z Barrios et al, 2014).

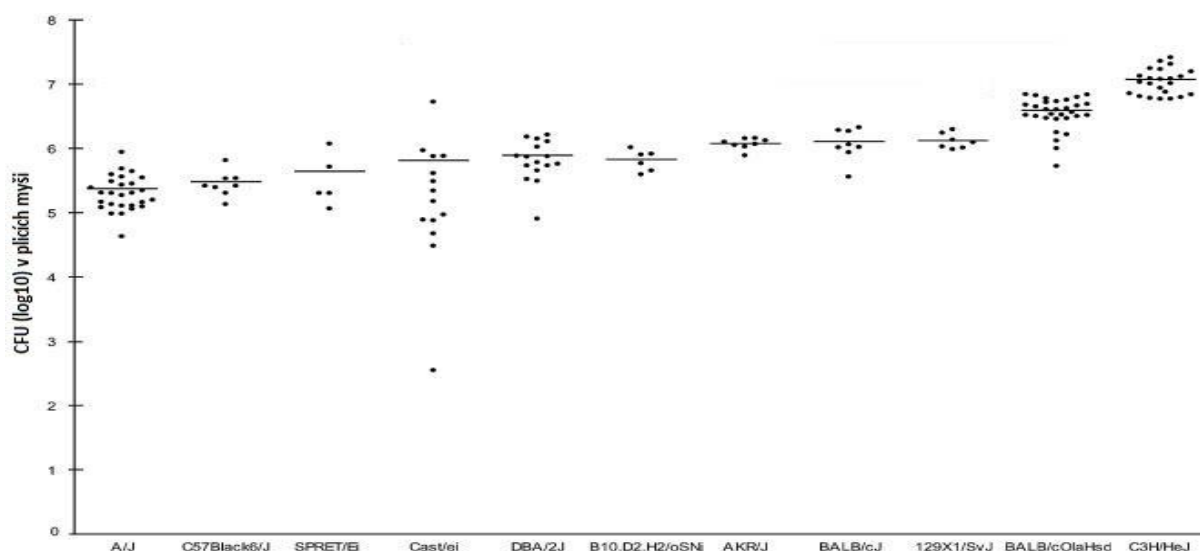
Dalším problémem je schopnost růstu a dělení bakterie v myších dýchacích cestách. Jak je vidět v grafu č. 1, při porovnání s příbuznou *B. bronchiseptica*, která je přirozeným zvířecím patogenem, bylo prokázáno, že *B. pertussis* infikuje dýchací cesty myši mnohem méně účinně. V důsledku toho je nutno během pokusů prováděných na myším modelu zavádět do dýchacího traktu velké množství bakterií (Harvill et al., 1999).



Graf 1: Kinetika kolonizace nosohltanu a průdušnice BALB/c myši bakterií *B. bronchiseptica* a *B. pertussis*. Skupina 4 samic starých 4 týdny BALB/c myši byla infikována dávkou 5×10^5 CFU *B. bronchiseptica* nebo *B. pertussis* (Převzato a upraveno z Harvill et al., 1999).

Jedním z důvodů problémů s kolonizací *B. pertussis* u myši je neschopnost bakterie růst a množit se v kompetitivním prostředí mikrobiomu v dýchacím traktu myši. Při porovnání osídlování dýchacího epitelu *B. bronchiseptica* a *B. pertussis* u myši ošetřených širokospektrálními antibiotiky a kontrolních neošetřených myši není *B. pertussis* schopna efektivně kolonizovat tracheální epitel osídlený myším mikrobiomem (Weyrich et al., 2014). Pro kontrolu schopnosti růstu byl proveden také pokus s kultivací *B. pertussis* s mikrobiomem lidského dýchacího ústrojí. Zde se potvrdilo, že *B. pertussis* je schopna koexistovat a množit se v prostředí s bakteriemi typicky osidlujícími lidské dýchací cesty (Weyrich et al., 2014).

Další úskalí představují genetické rozdíly jednotlivých laboratorních kmenů myši. Studie zkoumající celkem 11 kmenů myši, běžně používaných ve výzkumu, odhalila závislost mezi kolonizací *B. pertussis* a mutací v genu pro receptor TLR-4. Kmen C3H/HeJ, vykazující nejcitlivější reakci na infekci *B. pertussis*, nese mutaci v intracelulární doméně receptoru TLR-4. Oproti kmenu A/J, který se projevil jako nejvíce rezistentní vůči kolonizaci bakterií, byly v plicích myši C3H/HeJ usmrcených ve stejný den po infekci větší počty bakterií (viz Graf 2). Výrazný byl také úbytek na váze těchto myši a poškození dýchacího epitelu (Banus et al., 2006).



Graf 2: **Graf znázorňující množství bakterií *B. pertussis* v plicích 11 laboratorních kmenů intranazálně infikovaných myši.** Plíce byly odebrány 7 dní po infekci. Každý bod znázorňuje desítkový logaritmus počtu živých bakterií v plicích 1 myši. Horizontální linie značí průměr dané skupiny myši (Převzato a upraveno z Banus et al., 2006)

4.2 Potkan obecný laboratorní (*Rattus norvegicus*)

Potkan je, stejně jako myši model, hojně využíván v laboratořích po celém světě. Výhody potkanů jsou také ve velikosti tohoto modelu, nenáročném chovu, krátké generační době a vysokém počtu potomků.

Využívány jsou zejména kmeny speciálně vyšlechtěné pro laboratorní účely. Pro nalezení nejlépe vyhovujícího modelu pro studium *B. pertussis* byly zástupci čtyř nejběžněji využívaných kmenů potkanů bakterií infikovány. Již po 8 dnech byly patrné příznaky nemoci zejména u jedinců kmene Sprague – Dawley, a sice časté záchvaty kašle. Podle výsledků vážení a testů došlo u potkanů také k úbytku na váze a leukocytóze (Hall et al., 1997).

4.2.1 Infekce potkana bakterií *B. pertussis*

Stejně jako u myši, je i u potkana potřeba infikovat jedince dávkou živých bakterií zavedenou k horním cestám dýchacím tak, aby došlo k jejímu vdechnutí. První příznaky (viz 4.2) se u potkanů objevují po 5 - 8 dnech infekce. Imunitní systém potkana je schopen odstranit *B. pertussis* z dýchacího ústrojí již 10 – 12 dnů po infekci (Hall et al., 1997).

4.2.2 Využití modelu potkana pro studium *B. pertussis*

Potkan byl v devadesátých letech minulého století považován za potenciálně vyhovující zvířecí model pro výzkum interakce *B. pertussis* s hostitelem. Na potkanech byla testována i účinnost celobuněčných a nebuněčných vakcín. Výsledky prokázaly zvýšení protilátek IgE v organismu očkovaných jedinců, typických při bakteriální nebo parazitické infekci (Hall et al., 1998).

Od používání potkana jako modelového organismu pro studium *B. pertussis* se však upustilo a v současné době není potkan součástí žádného publikovaného výzkumu.

4.3 Králík obecný laboratorní (*Oryctolagus cuniculus*)

Vedle myši a potkana je králík dalším běžně užívaným zvířecím modelem ve vědě a výzkumu. Současně používání laboratorní králíci byli vyšlechtěni z evropského králíka. Tento model se využívá hlavně ve studiích biomedicínského, genetického nebo imunologického zaměření, a také při testování vakcín (Suckow et al., 2012).

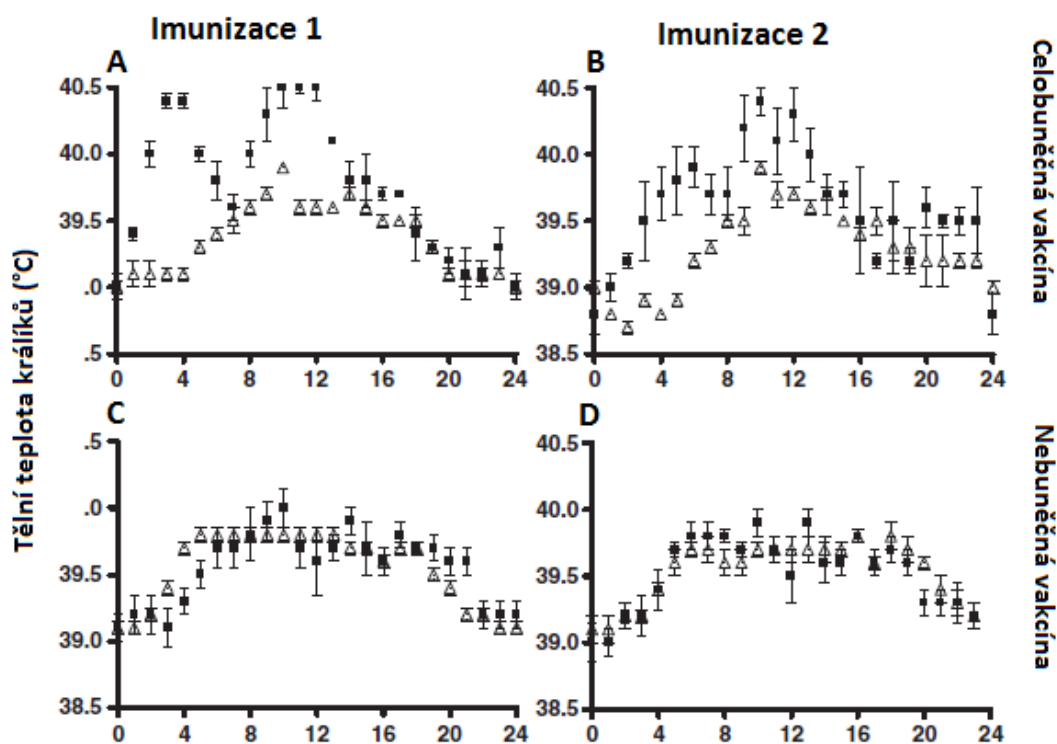
4.3.1 Využití modelu králíka

Jedinečnou výhodou králíčího modelu je především jeho využití k tvorbě polyklonálních protilátek při bakteriální infekci. Zejména při infekci gram-negativní bakterií, například *B. pertussis*, může dojít k navázání antigenů jako je LOS na povrch B lymfocytů. Vazbou těchto nespecifických bakteriálních antigenů na receptory B lymfocytů se spustí produkce protilátek zaměřujících se na jakýkoli patogen obsahující tento navázaný antigen. Mechanismus tvorby polyklonálních protilátek je nezávislý na Th2 lymfocytech a vede k velmi rychlé imunitní odpovědi organismu na infekci patogenem, zatímco dochází k tvorbě specifických protilátek interakcí Th2 buněk a B lymfocytů (Suckow et al., 2012).

Králíčí model je při výzkumu *B. pertussis* nejčastěji využíván pro testování toxicity, pyrogenicity a účinnosti nově vznikajících celobuněčných a nebuněčných vakcín, zejména těch obsahujících přidaný antigen LOS.

Studovaným jedincům je nejdříve chirurgicky zavedena sonda do peritoneální dutiny, zkoumající jejich měnící se tělesnou teplotu a srdeční tep. Takto zavedený čip poskytuje přesná data, měřená často každých 10 minut s přesností na 0,1°C, přímo zevnitř těla modelového

organizmu a nehrozí tedy chyba v měření. Zvíře zároveň není vystavováno neustálému stresu z manipulace a monitoringu (Kaaijk et al., 2013; Ideal loggers for biomedical studies, 2014). Po uplynutí doby rekonvalescence jsou králíci očkováni ve věku zhruba 12 týdnů, kdy obvykle dosahují hmotnosti 2-3 kg. Jejich váha odpovídá přibližné váze novorozence, což umožňuje očkování dvěma dávkami o stejném objemu jako u lidí, tedy 0,5 ml, v rozmezí 4 týdnů. Po celou dobu experimentu jsou jedinci váženi. Následně jsou odebrány vzorky krve a z těla je chirurgicky vyjmuta sonda pro měření teploty (Dias et al., 2013; Kaaijk et al., 2013). Imunitní odpověď modelových jedinců přichází v rámci hodin od aplikace očkovací látky. Během testování bezpečnosti vakcíny byl pozorován nárůst teploty očkovaných zvířat oproti kontrolním jedincům ošetřeným fyziologickým roztokem již 4 hodiny po aplikaci první očkovací dávky (viz Graf 3). Oproti tomu po aplikaci druhé očkovací dávky byl nárůst teploty minimální a již 24 hodin po očkování byly hodnoty tělních teplot všech testovaných jedinců v normálu. Během studie nedošlo k úbytku na váze žádného z jedinců. Sérologická vyšetření navíc potvrdila úspěšnou produkci protilátek proti antigenům *B. pertussis* (Kaaijk et al., 2013).



Graf 3 A-D: **Graf porovnání tělní teploty králíků.** Skupina králíků ošetřených fyziologickým roztokem a jedinců očkovaných 1 dávkou celobuněčné vakcíny (A) a 1 dávkou nebuněčné vakcíny (C). Porovnání teploty neočkované skupiny a králíků očkovaných 2. dávkou celobuněčné vakcíny (B) a nebuněčné vakcíny (D). Značkami v grafu jsou znázorněni testovaní jedinci. Data byla měřena prostřednictvím implantovaného čipu. (Převzato a upraveno z Kaaijk et al., 2013).

4.3.2 Nevýhody modelu králíka pro studium *B. pertussis*

Ač je pro studium a testování vakcín senzitivita imunitního systému tohoto modelu a rychlá schopnost reagovat na přítomnost antigenů výhodou, bylo v minulosti velmi často problémem reprodukovat a vyhodnotit získaná data. Jak se ukázalo, králík je velmi citlivý nejen na přítomnost patogenu nebo jeho antigenů, ale také na stres během probíhající studie. Bylo zjištěno, že produkci relevantních výsledků zajistí pouze standardizovaný postup během chovu (Verwer et al., 2009).

4.4 Prase domácí laboratorní (*Sus scrofa domestica*)

Sele se jako modelový organizmus využívá v biomedicínských oborech zhruba od druhé poloviny minulého století. Pro laboratorní účely byly speciálně vyšlechtěny kmeny tzv. miniaturních prasat, jejichž váha v dospělosti nepřekračuje 45 kg. Nejčastěji jsou prasata a selata využívána v embryologických, ontogenetických a imunologických výzkumech, ale také při studiu metabolismu nebo kardiovaskulárních onemocnění (Helke et al., 2015).

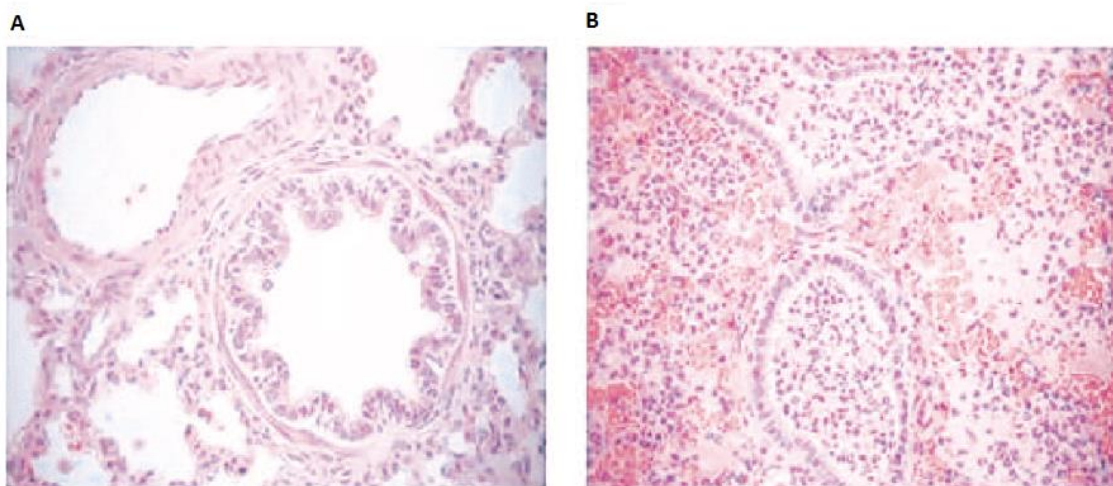
Z anatomického, fyziologického i imunologického hlediska je model prasete velmi podobný člověku, což je bezesporu velká výhoda a umožňuje to například jeho využití pro výzkum xenogenních transplantátů (Helke et al., 2015). Oproti myším modelu jsou i horní cesty dýchací uspořádány podobně jako u člověka. Navíc zde najdeme také nosní a krční uzliny připomínající lidský Waldeyerův okruh, tedy lymfatickou tkáň nosohltanu, která slouží jako ochrana před průnikem infekčních mikroorganismů (Horter et al., 2003).

4.4.1 Infekce modelu prasete bakterií *B. pertussis*

První výzkum infekce selete bakterií *B. pertussis* proběhl po roce 2000. Díky podobnosti prasete s člověkem se mělo za to, že model selete bude ideální pro studium mechanismu a průběhu infekce u novorozenců.

Během studie Elahi et al. (2005) byly infikovány dvě skupiny selat, a sice skupina třídních a skupina čtyřtýdních jedinců. Selatům byl do dýchacích cest zaveden nejběžněji používaný laboratorní kmen *B. pertussis* Tohama I. Již po dvou dnech byly u novorozených selat

pozorovatelné příznaky nemoci, jako zvýšená tělesná teplota, nepravidelné kašláni a obtíže s dýcháním, které přetrvávaly zhruba 2 týdny od infekce. Testovaná skupina výrazně ubyla na váze a u euthanazovaných zvířat byly patrné značné hemoragické a nekrotické nálezy na plicích. Při histopatologickém vyšetření se podařilo lokalizovat bakterie volně v průdušinkách a alveolách, navázané na epiteliální buňky, ale také na makrofágy (viz Obrázek 3 A,B) (Elahi et al., 2005).



Obrázek 3: **Histopatologické vyšetření plic.** Snímek plic neinfikovaného 4 dny starého selete (A). Histopatologické vyšetření plic 4 dny starého selete infikovaného *B. pertussis* (B). Zvětšení 400x + digitální zoom (Převzato a upraveno z Elahi et al., 2005).

Z toho vyplývá, že novorozená selata jsou vyhovujícím zvířecím modelem a *B. pertussis* je schopná kolonizovat jejich dýchací cesty. Oproti tomu u 4 týdnů starých selat se ani 3 týdny po infekci neobjevily žádné symptomy onemocnění. Navíc nebyly detekovány žádné bakterie ani léze v plicích usmrcených jedinců (Elahi et al., 2005).

4.4.2 Využití modelu prasete

V minulosti byl model prasete použit především pro výzkum ochrany novorozených potomků před infekcí *B. pertussis* prostřednictvím maternálního očkování. K transportu protilátek z matky do těla selete totiž nedochází během březosti, ale až skrze mlezivo a mateřské mléko během prvních 24 – 48 hodin po narození. Díky tomu je možné kontrolovat a zaznamenat množství a typ předaných protilátek (Helke et al., 2015).

V rámci studie Elahi et al. (2006 B) byly 4 březí samice prasete očkovány dvěma dávkami celobuněčné vakcíny, a to 4 a 2 týdny před narozením selat. Kontrolní samici byly injekčně aplikovány dávky fyziologického roztoku. Ihned po narození selat bylo samicím odebráno mlezivo a mateřské mléko k rozboru na přítomnost specifických protilátek proti *B. pertussis*. Dále byly odebrány krevní vzorky novorozených selat ještě před přiložením k matce, a znovu 4 dny po narození. Výsledky rozborů ukázaly vysoký počet specifických protilátek IgG a sekrečních IgA (s-IgA) proti *B. pertussis* v mlezivu a mléce očkovaných samic. Stejně tak byly tyto protilátky nalezeny v krvi čtyřdenních selat pouze očkovaných matek (Elahi et al., 2006 B).

Pro ověření hypotézy ochrany novorozenců před samotnou infekcí byla kontrolní selata i selata imunizovaných samic 5. den po narození infikována živými bakteriemi *B. pertussis*. U kontrolních selat se již dva dny po infekci projevily vážné symptomy, jako zvýšená tělní teplota, kašel a problémy s dýcháním. U selat očkovaných samic se nemoc projevila také, ale s mnohem mírnějším průběhem, tedy lehce zvýšenou teplotou a bez vážných dýchacích obtíží. Po histopatologickém vyšetření bylo patrné, že na rozdíl od kontrolních selat nebyla u potomků očkovaných samic zaznamenána žádná nebo mírná patologie plicní tkáně (Elahi et al., 2006 B).

4.4.3 Nevýhody modelu prasete pro studium *B. pertussis*

Na povrchu sliznic prasete se, stejně jako u člověka, nachází velké množství T lymfocytů, imunoglobulinů, buněk vrozené imunity, a také velké množství proteinů označovaných jako HDP (z anglického host defensive protein) zajišťujících ochranu před patogeny. Konkrétní prasečí defenzin pBD-1, homologní k lidskému beta defenzinu 2 přítomnému na sliznici dýchacích cest, hraje důležitou roli při kolonizaci *B. pertussis* (Elahi et al., 2006 A).

Přestože jsou novorozená selata schopna po infekci vykazovat typické symptomy nemoci, již 4 týdny stará selata jsou proti infekci *B. pertussis* zcela imunní. Tento fakt pravděpodobně souvisí s velmi účinnou slizniční imunitou, zabraňující bakterii kolonizovat hostitele. Dle studie již zmíněný defenzin p-BD 1, nacházející se na sliznici horních i dolních cest dýchacích prasete, zabraňuje kolonizaci hostitele a napomáhá likvidaci patogenu. Tento defenzin však nebyl nalezen na sliznici novorozených selat (Elahi et al., 2006 A).

Zajímavostí je, že přestože jsou starší selata proti *B. pertussis* zcela imunní, infekce *B. parapertussis* je schopná i u starších selat vyvolat příznaky onemocnění (Elahi et al., 2008).

Model selete se tedy ukázal jako vhodný pro výzkum vakcín a maternálního očkování. Vzhledem k jeho imunitě vůči nemoci v pokročilejším věku, velikosti a nárokům na chov ale nepatří mezi nejčastěji užívané modely.

4.5 Makak rhesus (*Macaca mulatta*)

Poprvé byli primáti jako modelový organismus pro studium *B. pertussis* použiti již ve třicátých letech minulého století. Od té doby proběhlo jen několik málo studií s modelem makaka. Při výzkumu byli porovnávány zejména druhy Makak rhesus, neboli *Macaca mulatta* a *Macaca cyclopsis*. Jedinci druhu *Macaca cyclopsis* se však stali ohroženým druhem a pro laboratorní výzkum již nejsou dostupní (Warfel et al., 2012 A).

4.5.1 Infekce modelu makaka bakterií *B. pertussis*

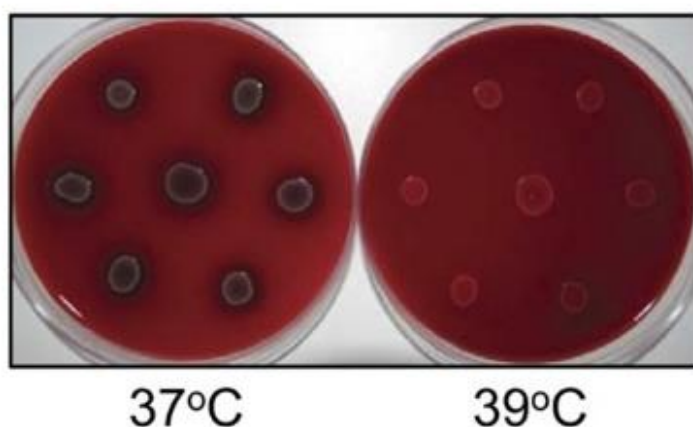
Během snahy najít co možná nejlépe vyhovující zvířecí model pro výzkum černého kašle proběhla studie zahrnující infekci druhu makak rhesus. Došlo však jen k potvrzení výsledků pokusů získaných před více než 60 lety, tedy že tento model je pro studium *B. pertussis* nevyhovující. Skupina makaků byla infikována živými bakteriemi laboratorního kmene Tohama I přímo do průdušnice. U žádného z primátů však nebyly pozorovány typické příznaky nemoci. Jediným ukazatelem infekce patogenem byl mírně zvýšený počet bílých krvinek v krevních vzorcích. Pokus byl zopakován se stejně starými jedinci, kteří byli infikováni bakteriálním kmenem izolovaným z dětského pacienta s velmi vážnými příznaky dávivého kašle. U dvou ze čtyř infikovaných makaků byl zaznamenán výrazný nárůst bílých krvinek, avšak jen jeden z nich byl postižen mírnými příznaky nemoci, jako lehké dýchací obtíže a kašel (Warfel et al., 2012 A).

4.5.2 Nevýhody modelu makaka pro studium *B. pertussis*

Důvodem neschopnosti *B. pertussis* infikovat dýchací cesty makaka může být vysoká tělní teplota tohoto primáta (Warfel et al., 2012 A). Normální tělní teplota makaka se pohybuje

okolo 39°C, zatímco ideální teplota pro produkci faktorů virulence *B. pertussis* je 37°C (Prugnola et al., 1995).

V rámci zmíněné studie byl proveden test kultivace bakterie v teplotách 37°C a 39°C. Výsledkem byl zpomalený růst *B. pertussis* v teplotě 39°C. Pozorována byla také neschopnost bakterie provádět na BG agaru hemolýzu typickou pro pěstování v teplotě 37°C (viz Obrázek 4), což vypovídá o inaktivním Bvg A/S systému bakterie při teplotě 39°C (Warfel et al., 2012 A).



Obrázek 4: **Fotografie BG agaru s koloniemi *B. pertussis*.** Kolonie byly pěstovány při teplotě 37°C a 39°C (Převzato a upraveno z Warfel et al., 2012 A).

4.6 Pavián anubi (*Papio anubis*)

V oblasti výzkumu *B. pertussis* jsou paviáni anubi poměrně novým modelem. Poprvé byli k tomuto účelu testováni roku 2012 (Warfel et al., 2012 A). Stejně jako ostatní primáti je pavián obecně využit jako modelový organizmus pro nespočet lidských nemocí, testování bezpečnosti léčiv a vakcín a do budoucna možná jako jeden z modelů vhodných ke xenotransplantacím. Z imunologického hlediska jde o model nejbližší člověku. Imunitní systém paviánů má stejné mechanismy reakcí na přítomnost patogena a boj s infekcí. Při zkoumání nejhojněji se vyskytujícího imunoglobulinu IgG bylo zjištěno, že *Papio anubis* produkuje stejné 4 podskupiny těchto protilátek jako člověk (Shearer et al., 1999).

4.6.1 Infekce modelu paviána bakterií *B. pertussis*

Infekce paviánů probíhá zavedením suspenze bakterií do horních cest dýchacích nebo až do průdušnice. Již dva dny po infekci je možné v dýchacích cestách všech nakažených primátů detekovat velké množství bakterií. Projevují se také symptomy typické pro černý kašel. Paviáni trpí lehce zvýšenou teplotou, po dobu zhruba 2 týdnů od infekce se u nich objevují záchvaty kašle a z krevních rozborů je patrná leukocytóza. Úplné odstranění bakterie z dýchacích cest přirozenou cestou je patrné po 4 - 5 týdnech (Warfel et al., 2012 A).

Při opakované infekci již vyléčených jedinců a zároveň kontrolní skupiny imunitně naivních paviánů byla zjištěna schopnost tvorby protilátek. U imunitně naivních jedinců došlo k rozvinutí nemoci a výraznému projevu typických symptomů. Oproti tomu znovu infikovaná skupina paviánů nevykazovala žádné známky onemocnění a množství bakterií v dýchacích cestách bylo několik dní po infekci velmi nízké (Warfel et al., 2012 C).

Detekcí protilátek metodou ELISA bylo zjištěno, že již 2 dny po infekci skupiny imunitně naivních paviánů došlo k několikanásobnému zvýšení množství interleukinů IL – 6, IL – 23 a IL-1 β zodpovědných za maturaci pomocných lymfocytů Th 17. Dále bylo u zvířat výrazně zvýšené množství interleukinu IL – 17, který je přítomný na sliznicích jak primátů, tak člověka a je důležitým zdrojem signalizace imunitním buňkám v případě infekce. Ke zvýšení IL – 17 v séru došlo i u jedinců ošetřených mrtvými buňkami bakterie. Interleukin IL – 17 byl detekován ve zvýšené míře i u paviánů znovu infikovaných po dvou letech od první infekce *B. pertussis*. Stejně jako u lidí, spouští infekce u paviána také odpověď Th 1 lymfocytů (Warfel et al., 2012 C).

4.6.2 Využití modelu paviána

Vzhledem ke schopnosti paviána vykazovat symptomy podobné člověku v krátkém čase po infikování *B. pertussis*, se začal tento model využívat ke studiu několika různých aspektů onemocnění černého kašle. Zajímavý je především výzkum přenosu bakterie mezi hostiteli. Díky podobnosti imunitní odpovědi paviánů na infekci *B. pertussis* jsou využíváni také k testování vakcín a výzkumu očkování novorozenců a matek ve 3. trimestru těhotenství.

4.6.2.1 Výzkum přenosu bakterie *B. pertussis* mezi hostiteli

Je všeobecně známo, že se bakterie *B. pertussis* přenáší mezi hostiteli kapénkově. Až s objevením paviána jako vhodného modelu se však mohlo přistoupit ke kontrolované studii přenosu bakterie a její schopnosti kolonizace nového hostitele.

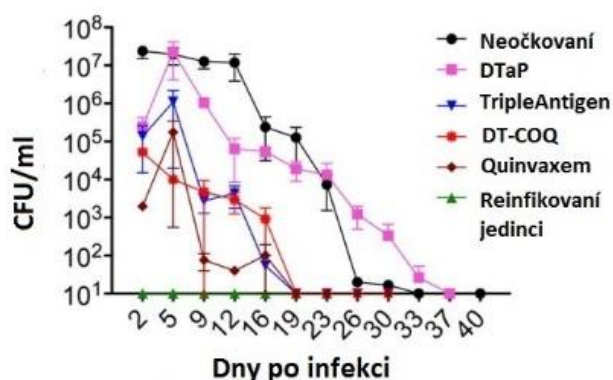
V rámci výzkumu byli dva paviáni infikováni bakterií a umístění do jedné klece se dvěma neinfikovanými jedinci. Třetí imunitně naivní pavián byl umístěn do klece vzdálené zhruba 2 metry, aby nemohlo dojít k přímému kontaktu s nakaženými paviány. Pomocí nosohltanových výplachů a krevních rozborů bylo zjištěno, že zdraví primáti umístění ve stejné kleci s těmi infikovanými byli kolonizováni bakterií po deseti dnech. Pavián umístěný v kleci na druhé straně místnosti vykazoval příznaky nemoci až v 19. den pokusu. Přenos infekce je tedy možný nejen přímým kontaktem s nakaženými jedinci, ale také vzduchem na větší vzdálenost (Warfel et al., 2012 B).

4.6.2.2 Výzkum účinnosti vakcín proti černému kašli

Vzhledem k příbuznosti paviána *Papio anubi* s člověkem, jeho schopnosti být kolonizován bakterií *B. pertussis* a přenášet infekci na další hostitele, se jedná o jednoznačně nejlepší a nejprůkaznější zvířecí model pro testování účinnosti vakcín.

Během studie byly dvě skupiny paviánů očkovány třemi dávkami celobuněčné vakcíny a čtyřmi dávkami nebuněčné vakcíny v rozmezí 6 měsíců. Následně byli tito jedinci spolu s kontrolní neočkovanou skupinou infikováni *B. pertussis* a pozorováni (Warfel et al., 2014 A).

Kontrolní skupina trpěla již 5 dní po infekci silnými záchvaty kašle a z nosohltanových výplachů byl patrný vysoký počet bakterií kolonizujících epitel dýchacích cest. K úplnému odstranění bakterie došlo u kontrolní skupiny paviánů až po 30 dnech. Jedinci očkovaní nebuněčnou vakcínou netrpěli žádnými viditelnými symptomy onemocnění, ani leukocytózou. Nicméně ačkoli byli kolonizováni menším počtem bakterií než kontrolní skupina, patogen byl v jejich dýchacím traktu přítomen 35 dní. Očkování celobuněčnou vakcínou také potlačilo symptomy infekce, navíc oproti nebuněčné vakcíně umožnilo paviánům odstranit bakterii již během 18 dní (Warfel et al., 2014 A). Ke stejnému výsledku došla i studie testující účinnost 3 různých celobuněčných vakcín v porovnání s nebuněčnou vakcínou (viz Graf 4) (Warfel et al., 2015).



Graf 4: Záznam koncentrace živých bakterií v dýchacích cestách testovaných zvířat. Rozbory dýchacích traktů prováděny v jednotlivých dnech po infekci (Převzato a upraveno z Warfel et al., 2015).

Model paviána byl v poslední době použit také během preklinického testování celobuněčné vakcinační látky obsahující živé oslabené buňky bakterie. C. Locht a jeho tým představili nového kandidáta na celobuněčnou vakcínu, označeného BPZE1, obsahujícího živé geneticky upravené bakterie *B. pertussis* (Mielcarek et al., 2006). Při testování bezpečnosti a účinnosti v modelovém organismu *Papio anubis* byl očkovací kmen vpravena do nosní dutiny a průdušnice mladých primátů, kde bakterie kolonizovala epitel a spustila imunitní odpověď a tvorbu protilátek. Samotný očkovací kmen nevyvolal v primátech žádné symptomy spojené s černým kašlem. Při následné infekci vysoce virulentním klinicky izolovaným kmenem *B. pertussis* D420 se u paviánů ošetřených BPZE1 neprojevovaly žádné příznaky nemoci a již 14 dní od infekce nebyly v jejich dýchacích cestách zaznamenány žádné živé bakterie (Locht et al., 2017).

4.6.2.3 Výzkum očkování novorozenců a maternálního očkování

Vzhledem k podobnosti imunitní odpovědi, produkovaných protilátek i tělesné stavbě a proporcím byl model paviána použit i k testování účinnosti a snášenlivosti očkování u novorozenců dětí a matek ve třetím trimestru těhotenství.

Očkování nebuněčnou vakcínou proběhlo u dvou paviánů již 2 dny po narození. Další dva paviáni byli navíc očkováni ještě druhou dávkou vakcíny. Po infikování těchto paviánů spolu

s kontrolními neočkovanými jedinci v 5. týdnu věku bylo zjištěno, že i když vakcína nezabránila kolonizaci jedinců, ochránila je před propuknutím nemoci. Dokonce ani paviáni očkovaní pouze jednou dávkou vakcíny nevykazovali žádné symptomy (Warfel et al., 2014 B).

Stejně tak mladí jedinci narození plně očkovaným samicím, jimž byla navíc ve třetím trimestru podána další dávka nebuněčné vakcíny, nevykazovali po infekci v 5. týdnu po narození žádné známky nemoci (Warfel et al., 2014 B).

4.6.3 Nevýhody modelu paviána pro studium *B. pertussis*

Pavián se ve všech dosud prováděných studiích profiluje jako ideální modelový organizmus pro výzkum infekce *B. pertussis*. Vzhledem k vysokým finančním nákladům a náročnému chovu je však model paviána využíván jen na několika málo speciálně uzpůsobených pracovištích.

4.7 Hostitel *Dictyostelium discoideum*

Bakterie rodu *Bordetellae* byly dlouhou dobu pokládány za patogena osidlujícího striktně savčí organizmy. Ačkoliv se předpokládala schopnost přežití těchto bakterií mimo hostitele, žádný mezihostitel ani mechanismus umožňující pobyt vně savce nebyly zaznamenány. Velmi překvapivým objevem byla schopnost bakterie *B. bronchiseptica*, příbuzné *B. pertussis*, přežívat a množit se v buňkách *Dictyostelium discoideum* (Taylor-Mulneix et al., 2017).

Dictyostelium discoideum se řadí mezi hlenky. Jedná se o eukaryotické buňky měňavkovitého tvaru žijící v půdě. Hlenky se živí fagocytózou bakterií. V případě jejich nedostatku se několik jedinců spojí a vytvoří mnohobuněčný organizmus produkující spory, které mohou být přenášeny na nová stanoviště pomocí větru nebo vody (Dormann et al., 2002). Tímto způsobem se *D. discoideum* může dostat také na dýchací sliznici savců a člověka (Badenoch et al., 1988; Winiecka-Krusnell et al., 2001).

Jak bylo zjištěno, *B. bronchiseptica* je schopna přežívat v buňkách *D. discoideum*. Bakterie byla lokalizována také v útvaru produkujícím spory, kde byla schopná se dělit a následně byla přenášena prostřednictvím spór (Taylor-Mulneix et al., 2017).

Na základě nejnovějších dat získaných porovnáním genetické výbavy *B. bronchiseptica* a *B. pertussis* bylo také zjištěno, že *B. pertussis* ztratila geny potřebné k přežití mimo hostitele. Přesto se však jedná o převratný objev důležitý pro pochopení mechanismů přenosu a infekce bakterií rodu *Bordetellae* (nepublikovaná data získaná osobní komunikací s E. Harvill, Ph.D.).

5 Závěr

Výzkum *B. pertussis*, specifického lidského patogena, je na modelových organizmech provázen řadou úskalí. Přesto je velmi důležitou součástí studií všech aspektů interakcí bakterie s hostitelem. Již v uplynulém století bylo provedeno mnoho výzkumů s cílem nalézt mezi běžně používanými laboratorními obratlovci co možná nejlepší modelový organizmus pro studium této bakterie.

Novorozená selata vykazovala po infekci typické symptomy nákazy *B. pertussis* a jsou vhodným modelem pro studium bakterie i očkovacích látek. Jako nevyhovující model se ale jeví model selete starší 4 týdnů. Důvodem je pravděpodobně efektivní slizniční imunita starších jedinců zabraňující kolonizaci *B. pertussis*. Téměř žádný efekt neměla infekce *B. pertussis* ani na jedince makaků. Tento primát se vyznačuje vyšší tělní teplotou a bakterie není schopna produkovat faktory virulence potřebné pro kolonizaci a infekci hostitele.

Model králíka je kvůli citlivosti imunitního systému užitečný při testech pyrogenicity vakcín a také svou vlastností tvořit polyklonální protilátky proti *B. pertussis*. Potkan oproti tomu není v posledních letech jako model využíván, i přes schopnost rozvoje infekce a typických příznaků onemocnění černého kašle.

Dosud nejlepším modelem pro studium *B. pertussis in vivo* je bezpochyby pavián anubi. U těchto primátů dochází jak ke snadné infekci, tak k přenosu mezi jedinci a projevům nemoci velmi podobných člověku. Vzhledem k vysokým nárokům na chov a financování je však použití paviána možné jen v několika málo institucích.

Při porovnání jak schopnosti interakce s bakterií *B. pertussis*, tak prostorových a finančních nároků, je pro základní výzkum faktorů virulence, toxicity vakcín a imunizace nejlépe vyhovujícím modelem myš domácí laboratorní. Jedná se o nejběžněji používaný model pro studium *B. pertussis*.

Podrobným studiem *B. pertussis in vivo* v některém z přijatelných modelových organizmů můžeme lépe porozumět chování bakterie v hostiteli a následně zkvalitnit preventivní opatření i léčbu nemoci.

6 *Literatura*

- Andreasen, C., & Carbonetti, N. H. (2008). Pertussis toxin inhibits early chemokine production to delay neutrophil recruitment in response to *Bordetella pertussis* respiratory tract infection in mice. *Infection and Immunity*, 76(11), 5139–5148.
- Aslan, A., Kurugöl, Z., Aydemir, S., Gürsel, D., Koturoglu, G. (2016). High frequency of pertussis in older children and adolescents with prolonged cough in Turkey. *The Turkish Journal of Pediatrics*, (58)1, 41-46.
- Badenoch, P. R., Grimmond, T. R., Cadwgan, J., Deayton, S. E., Essery, M. S. L., & Hill, B. D. (1988). Nasal Carriage of Free-Living Amoebae. *Microbial Ecology in Health & Disease*, 1(3).
- Banus, H. A., Vandebriel, R. J., de Ruiter, H., Dormans, J. A. M. A., Nagelkerke, N. J., Mooi, F. R., Hoebee, B., van Kranen, H. J., Klimman, T. G. (2006). Host genetics of *Bordetella pertussis* infection in mice: Significance of Toll-like receptor 4 in genetic susceptibility and pathobiology. *Infection and Immunity*, 74(5), 2596-260.
- Barrios, A. W., Núñez, G., Sánchez Quinteiro, P., Salazar, I. (2014). Anatomy, histochemistry, and immunohistochemistry of the olfactory subsystem in mice. *Frontiers in neuroanatomy*, 8, 63.
- Bergfors, E., Trollfors, B., Taranger, J., Lagergard, T., Sundh, V., Zackrisson, G. (1999). Parapertussis and pertussis: differences and similarities in incidence, clinical course, and antibody responses. *International Journal of Infectious Diseases*, 3(3), 140-146.
- Bonecchi, R., Bianchi, G., Bordignon, P. P., D'Ambrosio, D., Lang, R., Borsatti, A, Sinigaglia, F. (1998). Differential expression of chemokine receptors and chemotactic responsiveness of type 1 T helper cells (Th1s) and Th2s. *The Journal of Experimental Medicine*, 187(1), 129–134.
- Caroff, M., Aussel, L., Zarrouk, H., Martin, A., Richards, J.C., Thérissod, H., Perry, M.B., Karibian, D. (2001). Structural variability and originality of the *Bordetella* endotoxins. *Journal of endotoxin research*, 7(1), 63-68.
- Celentano, L. P., Massari, M., Paramatti, D., Salmaso, S., & Tozzi, A. E. (2005). Resurgence of

- pertussis in Europe. *The Pediatric Infectious Disease Journal*, 24(9), 761–5.
- Cherry, J. D., Seaton, B. L. (2012). Patterns of Bordetella parapertussis respiratory illnesses: 2008-2010. *Clinical Infectious Diseases*, 54(4), 534-537.
- Confer, D., & Eaton, J. (1982). Phagocyte impotence caused by an invasive bacterial adenylate cyclase. *Science*, 217(4563), 948–950.
- Connelly, C. E., Sun, Y., & Carbonetti, N. H. (2012). Pertussis toxin exacerbates and prolongs airway inflammatory responses during bordetella pertussis infection. *Infection and Immunity*, 80(12), 4317–4332.
- Cookson, B. T., Cho, H. L., Herwaldt, L. A., & Goldman, W. E. (1989). Biological activities and chemical composition of purified tracheal cytotoxin of Bortella pertussis. *Infection and Immunity*, 57(7), 2223–2229.
- Cowell, J. L., Hewlett, E. L., & Manclark, C. R. (1979). Intracellular localization of the dermonecrotic toxin of Bordetella pertussis. *Infection and Immunity*, 25(3), 896–901.
- De Gouw, D., Diavatopoulos, D. A., Bootsma, H. J., Hermans, P. W. M., & Mooi, F. R. (2011). Pertussis: A matter of immune modulation. *FEMS Microbiology Reviews*.
- Dias, W. O., Van Der Ark, A. A. J., Sakauchi, M. A., Kubrusly, F. S., Prestes, A. F. R. O., Borges, M. M., Raw, I. (2013). An improved whole cell pertussis vaccine with reduced content of endotoxin. *Human Vaccines and Immunotherapeutics*, 9(2), 339–348.
- Dormann, D., Vasiev, B., & Weijer, C. J. (2002). Becoming multicellular by aggregation; the morphogenesis of the social amoebae Dicyostelium discoideum. In *Journal of Biological Physics* (Vol. 28, pp. 765–780).
- Elahi, S., Brownlie, R., Korzeniowski, J., Buchanan, R., O'Connor, B., Peppler, M. S., Gerdts, V. (2005). Infection of newborn piglets with Bordetella pertussis: A new model for pertussis. *Infection and Immunity*, 73(6), 3636–3645.
- Elahi, S., Buchanan, R. M., Attah-poku, S., Townsend, H. G. G., Babiuk, L. a, & Gerdts, V. (2006 **A**). The Host Defense Peptide Beta-Defensin 1 Confers Protection against Bordetella pertussis in Newborn Piglets The Host Defense Peptide Beta-Defensin 1 Confers Protection against Bordetella pertussis in Newborn Piglets. *Infection and Immunity*, 74(4),

2338–2352.

- Elahi, S., Buchanan, R. M., Babiuk, L. A., & Gerdt, V. (2006 B). Maternal immunity provides protection against pertussis in newborn piglets. *Infection and Immunity*, 74(5), 2619–2627.
- Elahi, S., Thompson, D. R., Strom, S., O'Connor, B., Babiuk, L. A., Gerdt, V. (2008). Infection with *Bordetella parapertussis* but not *Bordetella pertussis* causes pertussis-like disease in older pigs. *Journal of Infectious Diseases*, 198(3), 384-392.
- Fedele, G., Spensieri, F., Palazzo, R., Nasso, M., Cheung, G. Y. C., Coote, J. G., & Ausiello, C. M. (2010). *Bordetella pertussis* commits human dendritic cells to promote a Th1/Th17 response through the activity of adenylate cyclase toxin and MAPK-pathways. *PLoS ONE*, 5(1).
- Gaines-Das, R., Horiuchi, Y., Zhang, S. M., Newland, P., Kim, Y., Corbel, M., & Xing, D. (2009). Modified intra-cerebral challenge assay for acellular pertussis vaccines: Comparisons among whole cell and acellular vaccines. *Vaccine*, 27(49), 6824–6832.
- Goodwin, M. S. M., & Weiss, A. A. (1990). Adenylate cyclase toxin is critical for colonization and pertussis toxin is critical for lethal infection by *Bordetella pertussis* in infant mice. *Infection and Immunity*, 58(10), 3445–3447.
- Gomez, S.R., Yuen, C.T., Asokanathan, C., Douglas-Bardsley, A., Corbel, M.J., Coote, J.G., Parton, R., Xing, D.K. (2007). ADP - ribosylation activity in pertussis vaccines and its relationship to the in vivo histamine - sensitisation test. *Vaccine*, 25(17), 3311-3318.
- Gueirard, P., Weber, C., LeCoustumier, A., Guiso, N. (1995). Human *Bordetella bronchiseptica* infection related to contact with infected animals: persistence of bacteria in host. *Journal of Clinical Microbiology*, 33(8), 2002-2006.
- Guermonprez, P., Khelef, N., Blouin, E., Rieu, P., Ricciardi-Castagnoli, P., Guiso, N., Leclerc, C. (2001). The Adenylate Cyclase Toxin of *Bordetella pertussis* Binds to Target Cells via the M 2 Integrin (CD11b/CD18). *J. Exp. Med*, 193(9), 1035–1044.
- Guiso, N. (2009). *Bordetella pertussis* and pertussis vaccines. *Clinical Infectious Diseases*, 49(10), 1565–9.

- Gustafsson, L., Hallander, H. O., Olin, P., Reizenstein, E., & Storsaeter, J. (1996). A controlled trial of a two-component acellular, a five-component acellular, and a whole-cell pertussis vaccine. *The New England Journal of Medicine*, 334(6), 349–355.
- Hall, E., Parton, R., & Wardlaw, A. C. (1997). Differences in coughing and other responses to intrabronchial infection with *Bordetella pertussis* among strains of rats. *Infection and Immunity*, 65(11), 4711–4717.
- Hall, E., Parton, R., & Wardlaw, A. C. (1998). Responses to acellular pertussis vaccines and component antigens in a coughing-rat model of pertussis. *Vaccine*, 16(17), 1595–1603.
- Han, S. B., Kang, K. R., Huh, D. H., Lee, H. C., Lee, S. Y., Kim, J., Kang, J. H. (2015). Preliminary study on the immunogenicity of a newly developed GCC Tdap vaccine and its protection efficacy against *Bordetella pertussis* in a murine intranasal challenge model. *Clinical and Experimental Vaccine Research*, 4, 75–82.
- Harkema, J. R., Carey S. A., Wagner, J. G. (2006). The nose revisited: A brief review of the comparative structure, function, and toxicologic pathology of the nasal epithelium. *Toxicologic Pathology*, 34, 252–269.
- Harvill, E. T., Cotter, P. A., & Miller, J. F. (1999). Pregenomic comparative analysis between *Bordetella bronchiseptica* RB50 and *Bordetella pertussis* Tohama I in murine models of respiratory tract infection. *Infection and Immunity*, 67(11), 6109–6118.
- Harvill, E. T., Preston, A., Cotter, P. A., Allen, A. G., Maskell, D. J., & Miller, J. F. (2000). Multiple roles for *Bordetella* lipopolysaccharide molecules during respiratory tract infection. *Infection and Immunity*, 68(12), 6720–6728.
- Hazes, B., & Read, R. J. (1997). Accumulating evidence suggests that several AB-toxins subvert the endoplasmic reticulum-associated protein degradation pathway to enter target cells. *Biochemistry*.
- Hedrich, H. (2012). The Laboratory Mouse. *Academic press, Second Edition*, 97–161.
- Helke, K. L., Ezell, P. C., Duran-Struuck, R., & Swindle, M. M. (2015). Chapter 16 - Biology and Diseases of Swine. In *Laboratory Animal Medicine: Third Edition*, 695–769.
- Horter, D. C., Yoon, K. J., Zimmerman, J. J. (2003). A review of porcine tonsils in immunity and

- disease. *Animal Health Research Reviews*, 4(2), 143-155.
- Chlibek, R.; Smetana, J.; Sosovickova, R.; Fabianova, K.; Zavadilova, J.; Dite, P.; Gal, P.; Naplava, P.; Lzicarova, D. (2017). Seroepidemiology of whooping cough in the Czech Republic: estimates of incidence of infection in adults. *Public Health*, 77-83
- Inatsuka, C. S., Xu, Q., Vujkovic-Cvijin, I., Wong, S., Stibitz, S., Miller, J. F., & Cotter, P. A. (2010). Pertactin is required for *Bordetella* species to resist neutrophil-mediated clearance. *Infection and Immunity*, 78(7), 2901–2909.
- Kaaijk, P., Van Der Ark, A. A. J., Van Amerongen, G., & Van Den Dobbelsteen, G. P. J. M. (2013). Nonclinical vaccine safety evaluation: Advantages of continuous temperature monitoring using abdominally implanted data loggers. *Journal of Applied Toxicology*, 33(6), 521–526.
- Kaneko, T., Goldman, W. E., Mellroth, P., Steiner, H., Fukase, K., Kusumoto, S., Silverman, N. (2004). Monomeric and polymeric gram-negative peptidoglycan but not purified LPS stimulate the *Drosophila* IMD pathway. *Immunity*, 20(5), 637–649.
- Katada, T., Tamura, M., & Ui, M. (1983). The A protomer of islet-activating protein, pertussis toxin, as an active peptide catalyzing ADP-ribosylation of a membrane protein. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 224(1), 290–298.
- Kendrick, P. L., Eldering, G., Dixon, M. K., Misner, J. (1947). Mouse protection tests in the study of pertussis vaccine. *American Journal of Public Health*. 7. 804-810.
- Klein, N. P., Bartlett, J., Fireman, B., Rowhani-Rahbar, A., & Baxter, R. (2013). Comparative effectiveness of acellular versus whole-cell pertussis vaccines in teenagers. *Pediatrics*, 131(6), e1716-22.
- Kolls, J. K., & Khader, S. A. (2010). The role of Th17 cytokines in primary mucosal immunity. *Cytokine and Growth Factor Reviews*, 21(6), 443–448.
- Kwon, H. J., Han, S. B., Kim, B. R., Kang, K. R., Huh, D. H., Choi, G. S., Kang, J. H. (2017). Assessment of safety and efficacy against *Bordetella pertussis* of a new tetanus-reduced dose diphtheria-acellular pertussis vaccine in a murine model. *BMC Infectious Diseases*, 17(1), 247.
- Le Dur, A., Chaby, R., & Szabo, L. (1980). Isolation of two protein-free and chemically different

- lipopolysaccharides from *Bordetella pertussis* phenol-extracted endotoxin. *Journal of Bacteriology*, 143(1), 78–88.
- Leininger, E., Roberts, M., Kenimer, J. G., Charles, I. G., Fairweather, N., Novotny, P., & Brennan, M. J. (1991). Pertactin, an Arg-Gly-Asp-containing *Bordetella pertussis* surface protein that promotes adherence of mammalian cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 88(2), 345–9.
- Liu, D. F., Phillips, E., Wizemann, T. M., Siegel, M. M., Tabei, K., Cowell, J. L., & Tuomanen, E. (1997). Characterization of a recombinant fragment that contains a carbohydrate recognition domain of the filamentous hemagglutinin. *Infection and Immunity*, 65(8), 3465–3468.
- Masin, J., Osickova, A., Sukova, A., Fiser, R., Halada, P., Bumba, L., Linhartova, I., Osicka, R., Sebo, P. (2016). Negatively charged residues of the segment linking the enzyme and cytolysin moieties restrict the membrane-permeabilizing capacity of adenylate cyclase toxin. *Scientific reports*, 6, 29137.
- Masuda, M., Betancourt, L., Matsuzawa, T., Kashimoto, T., Takao, T., Shimonishi, Y., & Horiguchi, Y. (2000). Activation of rho through a cross-link with polyamines catalyzed by *Bordetella dermonecrotizing* toxin. *The EMBO Journal*, 19(4), 521–30.
- McGuirk, P., McCann, C., & Mills, K. H. G. (2002). Pathogen-specific T Regulatory 1 Cells Induced in the Respiratory Tract by a Bacterial Molecule that Stimulates Interleukin 10 Production by Dendritic Cells. *The Journal of Experimental Medicine*, 195, 221–231.
- Mielcarek, N., Debie, A. S., Raze, D., Bertout, J., Rouanet, C., Younes, A. B., Creusy, C., Engle, J., Goldman, W. E., Loch, C. (2006). Live attenuated *B. pertussis* as a single-dose nasal vaccine against whooping cough. *Public Library of Science Pathogens*, 2(7), 65.
- Mills, K. H. G., Barnard, A., Watkins, J., & Redhead, K. (1993). Cell-mediated immunity to *Bordetella pertussis*: Role of Th1 cells in bacterial clearance in a murine respiratory infection model. *Infection and Immunity*, 61(2), 399–410.
- Mills, K. H. G., Ryan, M., Ryan, E., & Mahon, B. P. (2015). A Murine Model in Which Protection Correlates with Pertussis Vaccine Efficacy in Children Reveals Complementary Roles for Humoral and Cell-Mediated Immunity in Protection against *Bordetella pertussis*, 66(2),

1–9.

- Locht, C., Papin, J. F., Lecher, S., Debie, A. S., Thalen, M., Solovay, K., Rubin, K., Mielcarek, N. (2017). Live attenuated pertussis vaccine BPZE 1 protects baboon against *B. pertussis* disease and infection. *Oxford University Press for the Infectious Diseases Society of America*.
- Paddock, C. D., Sanden, G. N., Cherry, J. D., Gal, A. A., Langston, C., Tatti, K. M., Zaki, S. R. (2008). Pathology and pathogenesis of fatal *Bordetella pertussis* infection in infants. *Clinical Infectious Diseases : An Official Publication of the Infectious Diseases Society of America*, 47(3), 328–38.
- Parkhill, J., Sebaihia, M., Preston, A., Murphy, L. D., Thomson, N., Harris, D. E., Holden, M. T., Churcher, C. M., Bentley, S. D., Mungall, K. L., Cerdeño-Tárraga, A. M., Temple, L., James, K., Harris, B., Quail, M. A., Achtman, M., Atkin, R., Baker, S., Basham, D., Bason, N., Cherevach, I., Chillingworth, T., Collins, M., Cronin, A., Davis, P., Doggett, J., Feltwell, T., Goble, A., Hamlin, N., Hauser, H., Holroyd, S., Jagels, K., Leather, S., Moule, S., Norberczak, H., O'Neil, S., Ormond, D., Price, C., Rabinowitsch, E., Rutter, S., Sanders, M., Saunders, D., Seeger, K., Sharp, S., Simmonds, M., Skelton, J., Squares, R., Squares, S., Stevens, K., Unwin, L., Whitehead, S., Barrell, B. G., Maskell, D. J. (2003). Comparative analysis of the genome sequences of *Bordetella pertussis*, *Bordetella parapertussis* and *Bordetella bronchiseptica*. *Nature genetics*, 35(1), 32–40.
- Prevention, C. for D. C. and. (2012). Pertussis epidemic - Washington, 2012. *Morbidity & Mortality Weekly Report*, 61(28), 517–522.
- Prugnola, A., Ario, B., Manetti, R., Rappuoli, R., & Scarlato, V. (1995). Response of the bvg regulon of *Bordetella pertussis* to different temperatures and short-term temperature shifts. *Microbiology*, 141(10), 2529–2534.
- Queenan, A. M., Fernandez, J., Shang, W., Wiertsema, S., van den Dobbelsteen, G. P., & Poolman, J. (2014). The mouse intranasal challenge model for potency testing of whole-cell pertussis vaccines. *Expert Review of Vaccines*, 13(10), 1265–1270.
- Romero, R. V., Hasan, S., Faé, K., Holubova, J., Geurtsen, J., Schwarzer, M., Wiertsema, S., Osicka, R., Poolman, J., Sebo, P. (2016). *Bordetella pertussis* filamentous hemagglutinin

- itself does not trigger anti-inflammatory interleukin-10 production by human dendritic cells. *International Journal of Medical Microbiology*, 306. 38-47.
- Rosenthal, R. S., Nogami, W., Cookson, B. T., Goldman, W. E., & Folkening, W. J. (1987). Major fragment of soluble peptidoglycan released from growing *Bordetella pertussis* is tracheal cytotoxin. *Infection and Immunity*, 55(9), 2117–2120.
- Roy, C. R., Miller, J. F., & Falkow, S. (1989). The *bvgA* gene of *Bordetella pertussis* encodes a transcriptional activator required for coordinate regulation of several virulence genes. *Journal of Bacteriology*, 171(11), 6338–6344.
- Serra, D. O., Conover, M. S., Arnal, L., Sloan, G. P., Rodriguez, M. E., Yantorno, O. M., & Deora, R. (2011). FHA-mediated cell-substrate and cell-cell adhesions are critical for *Bordetella pertussis* biofilm formation on abiotic surfaces and in the mouse nose and the trachea. *PLoS ONE*, 6(12).
- Serra, D. O., Lücking, G., Weiland, F., Schulz, S., Görg, A., Yantorno, O. M., & Ehling-Schulz, M. (2008). Proteome approaches combined with Fourier transform infrared spectroscopy revealed a distinctive biofilm physiology in *Bordetella pertussis*. *Proteomics*, 8(23–24), 4995–5010.
- Shearer, M. H., Dark, R. D., Chodosh, J., & Kennedy, R. C. (1999). Comparison and characterization of immunoglobulin G subclasses among primate species. *Clinical and Diagnostic Laboratory Immunology*, 6(6), 953–958.
- Scheller, E. V., & Cotter, P. A. (2015). *Bordetella* filamentous hemagglutinin and fimbriae: critical adhesins with unrealized vaccine potential. *Pathogens and Disease*, 73(8), 79.
- Sloan, G. P., Love, C. F., Sukumar, N., Mishra, M., & Deora, R. (2007). The *Bordetella* Bps polysaccharide is critical for biofilm development in the mouse respiratory tract. In *Journal of Bacteriology* (189), pp. 8270–8276.
- Spensieri, F., Fedele, G., Fazio, C., Nasso, M., Stefanelli, P., Mastrantonio, P., Ausiello, C. M. (2006). *Bordetella pertussis* inhibition of interleukin-12 (IL-12) p70 in human monocyte-derived dendritic cells blocks IL-12 p35 through adenylate cyclase toxin-dependent cyclic AMP induction. *Infection and immunity*, 74(5), 2831-2838.

- Stein, P. E., Boodhoo, a, Armstrong, G. D., Cockle, S. a, Klein, M. H., & Read, R. J. (1994). The crystal structure of pertussis toxin. *Structure (London, England : 1993)*, 2(1), 45–57.
- Stibitz, S., & Yang, M. S. (1991). Subcellular localization and immunological detection of proteins encoded by the vir locus of *Bordetella pertussis*. *Journal of Bacteriology*, 173(14), 4288–4296.
- Suckow, M., Stevens, K., & Wilson, R. (2012). *The Laboratory Rabbit, Guinea Pig, Hamster, and Other Rodents*. Academic Press, 259- 263.
- Support, O. (2014). Ideal loggers for biomedical studies, 1–2.
- Taylor-Mulneix, D. L., Bendor, L., Linz, B., Rivera, I., Ryman, V. E., Dewan, K. K., Harvill, E. T. (2017). *Bordetella bronchiseptica* exploits the complex life cycle of *Dictyostelium discoideum* as an amplifying transmission vector. *PLOS Biology*, 15(4), 420.
- Uhl, M. A., & Miller, J. F. (1994). Autophosphorylation and phosphotransfer in the *Bordetella pertussis* BvgAS signal transduction cascade. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 91(3), 1163–1167.
- Verwer, C. M., van der Ark, A., van Amerongen, G., van den Bos, R., & Hendriksen, C. F. M. (2009). Reducing variation in a rabbit vaccine safety study with particular emphasis on housing conditions and handling. *Laboratory Animals*, 43(2), 155–164.
- Von König, C.-H. W. (2005). Use of antibiotics in the prevention and treatment of pertussis. *The Pediatric Infectious Disease Journal*, 24, S66–S68.
- Warfel, J. M., Beren, J., Kelly, V. K., Lee, G., & Merkel, T. J. (2012 A). Nonhuman primate model of pertussis. *Infection and Immunity*, 80(4), 1530–1536.
- Warfel, J. M., Beren, J., & Merkel, T. J. (2012 B). Airborne transmission of *bordetella pertussis*. *Journal of Infectious Diseases*, 206(6), 902–906.
- Warfel, J. M., & Merkel, T. J. (2012 C). *Bordetella pertussis* infection induces a mucosal IL-17 response and long-lived Th17 and Th1 immune memory cells in nonhuman primates. *Mucosal Immunology*, 6(4), 787–796.
- Warfel, J. M., Zimmerman, L. I., & Merkel, T. J. (2014 A). Acellular pertussis vaccines protect against disease but fail to prevent infection and transmission in a nonhuman primate

- model. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 111(2), 787–92.
- Warfel, J. M., Papin, J. F., Wolf, R. F., Zimmerman, L. I., & Merkel, T. J. (2014 B). Maternal and neonatal vaccination protects newborn baboons from pertussis infection. *Journal of Infectious Diseases*, 210(4), 604–610.
- Warfel, J. M., Zimmerman, L. I., & Merkel, T. J. (2015). Comparison of three whole-cell pertussis vaccines in the baboon model of pertussis. *Clinical and Vaccine Immunology*, 23(1), 47–54.
- Weiss, A. A., & Mary, G. M. S. (1989). Lethal infection by *Bordetella pertussis* mutants in the infant mouse model. *Infection and Immunity*, 57(12), 3757–3764.
- Weyrich, L. S., Feaga, H. A., Park, J., Muse, S. J., Safi, C. Y., Rolin, O. Y., Harvill, E. T. (2014). Resident microbiota affect *bordetella pertussis* infectious dose and host specificity. *Journal of Infectious Diseases*, 209(6), 913–921.
- WHO TRS 979. (2013). Annex 4 Recommendations to assure the quality , safety and efficacy of acellular pertussis vaccines, (786), 189–240.
- Wilk, M. M., Misiak., A., McManus, R. M., Allen, A. C., Lynch, M. A., Mills, K. H. G. (2017). Lung CD4 Tissue - resident memory T cells mediate adaptive immunity induced by previous infection of mice with *Bordetella pertussis*. *The Journal of immunology*. 233-243.
- Winiecka-Krusnell, J., & Linder, E. (2001). Bacterial infections of free-living amoebae. *Research in Microbiology*, 152(7), 613-619.
- Winter, K., Glaser, C., Watt, J., Harriman, K., & Centers for Disease Control and Prevention (CDC). (2014). Pertussis epidemic--California, 2014. *MMWR. Morbidity and Mortality Weekly Report*, 63(48), 1129–32.
- Wong, W. S., & Rosoff, P. M. (1996). Pharmacology of pertussis toxin B-oligomer. *Can J Physiol Pharmacol*, 74(5), 559–564.
- Xing, D., Asokanathan, C., Xu, Y. H., Bolgiano, B., Douglas-Bardsley, A., Zhang, S., Corbel, M. (2014). Relationship of immunogenicity to protective potency in acellular pertussis vaccines. *Human Vaccines and Immunotherapeutics*, 10(7), 2066–2073.

